

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

PCT/JPC3/16523

JP03/16523

24.12.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日      2 0 0 3 年   7 月 2 8 日  
Date of Application:

出 願 番 号      特 願 2 0 0 3 - 2 0 2 7 0 8  
Application Number:  
[ST. 10/C] :      [ J P 2 0 0 3 - 2 0 2 7 0 8 ]

出 願 人      梶 原   康 宏  
Applicant(s):      大塚化学株式会社

REC'D 19 FEB 2004

WIPO

PCT

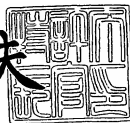
**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年   2 月   6 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 S20319

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C07K 2/00

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市都筑区牛久保東 2-4-2-205

【氏名】 梶原 康宏

【発明者】

【住所又は居所】 奈良県奈良市法蓮町北 1-1226

【氏名】 掛樋 一晃

【発明者】

【住所又は居所】 徳島県徳島市加賀須野 463 大塚化学株式会社研究技術センター内

【氏名】 深江 一博

【特許出願人】

【識別番号】 502244258

【氏名又は名称】 梶原 康宏

【特許出願人】

【識別番号】 302060306

【氏名又は名称】 大塚化学株式会社

【代理人】

【識別番号】 100081536

【弁理士】

【氏名又は名称】 田村 巖

【電話番号】 06-6864-3137

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 020086

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 糖鎖アスパラギン誘導体およびその製造法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 脂溶性の保護基でアスパラギンのアミノ基窒素が保護された糖鎖アスパラギンの非還元末端側の N-アセチルグルコサミンに少なくとも 1 個以上のフコースを含む糖鎖アスパラギン誘導体。

【請求項 2】 脂溶性の保護基でアスパラギンのアミノ基窒素が保護された糖鎖アスパラギンをフコース転移酵素を用いてフコースを転移させ、得られた脂溶性の保護基で保護された糖鎖アスパラギンをクロマトグラフィーに供することにより分離することを特徴とする脂溶性の保護基でアスパラギンのアミノ基窒素が保護された糖鎖アスパラギンの非還元末端側の N-アセチルグルコサミンに少なくとも 1 個以上のフコースを含む糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明はフコースを含む糖鎖アスパラギン誘導体およびその製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

近年、核酸（DNA）、タンパク質に続く第三の鎖状生命分子として、糖鎖分子が注目されてきている。ヒトの体は、約 60 兆個の細胞から成っている一大細胞社会であり、全ての細胞表面は糖鎖分子によって覆われている。例えば、ABO 式血液型は細胞表面の糖鎖の違いにより決定されている。

糖鎖は、細胞間の認識や相互作用に関わる働きをもち、細胞社会を成り立たせる要となっている。細胞社会の乱れは、癌、慢性疾患、感染症、老化などにつながる。

【0003】

例えば、細胞が癌化すると糖鎖の構造変化が起こることが分かっている。また、コレラ菌やインフルエンザウイルスなどは、ある特定の糖鎖を認識し結合する。

ことにより、細胞に侵入し感染することが知られている。

糖鎖機能の解明は、新しい原理に基づく医薬品や食品の開発などをもたらし、病気の予防、治療に貢献するなど、幅広い応用が期待されている。

糖鎖は単糖の配列、結合様式・部位、鎖の長さ・分岐様式、全体の高次構造などの多様性から、核酸やタンパク質の構造と比べると非常に複雑な構造である。従って、その構造に由来する生物学的な情報は核酸やタンパク質に比べて多種多様である。糖鎖は、研究の重要性を認識されながらも、その構造の複雑さや多様性により、核酸やタンパク質に比べて研究の推進が遅れている状況にある。

#### 【0004】

上記のように細胞膜表面や血清などに存在するタンパク質の多くは糖鎖が結合している。糖鎖がタンパク質に共有結合した分子は糖タンパク質とよばれ、糖とタンパク質との結合様式の違いから2つのグループに分けることができる。一つはアスパラギン (A s n) の側鎖のアミノ基と糖鎖が結合したアスパラギン結合型糖鎖 (N-グリコシド結合型) である。もう一方はセリン (S e r) やスレオニン (T h r) のアルコールに糖鎖が結合したムチン結合型糖鎖 (O-グリコシド結合型) である。すべてのアスパラギン結合型糖鎖は5つの糖残基からなる基本骨格をもち、結合する糖鎖の非還元末端の糖残基の種類によって高マンノース型、複合型、混成型のサブグループに分類される。

#### 【0005】

##### 【発明が解決しようとする課題】

このように糖鎖は重要な化合物ではあるが、糖鎖の絶対量の不足がある。糖鎖を得る手段として、生体内に存在する糖タンパク質から糖鎖だけを遊離させる方法がある。しかし糖タンパク質から糖鎖を大量に切り出すのは、困難であり、生体内には構造が酷似した糖鎖が多く存在し、単一の糖鎖のみを大量に得るのは難しい。また、生体内に存在しない糖鎖は、大量に入手するのは困難である。

#### 【0006】

本発明の課題は、脂溶性の保護基でアスパラギンのアミノ基窒素が保護された糖鎖アスパラギンの非還元末端側のN-アセチルグルコサミンに少なくとも1個以上のフコースを含む新規な糖鎖アスパラギン誘導体とその製造方法を提供する

ことにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明は、脂溶性の保護基でアスパラギンのアミノ基窒素が保護された糖鎖アスパラギンの非還元末端側のN-アセチルグルコサミンに少なくとも1個以上のフコースを含む糖鎖アスパラギン誘導体、及びその製造方法に係る。

【0008】

本発明者は、先に特願2001-185685号（以下、先願という）において、種々の単離された糖鎖アスパラギン誘導体を従来に比べて非常に容易かつ大量に得ることができる、糖鎖アスパラギン誘導体、糖鎖アスパラギン、糖鎖の製造方法、更には糖残基が任意に欠失した糖鎖が結合した新規な糖鎖アスパラギン誘導体、糖鎖アスパラギン、糖鎖を開発した。

【0009】

この先願の方法は例えば

(1) (a) 1種もしくは2種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物に含まれる該糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入して糖鎖アスパラギン誘導体混合物を得る工程、

ならびに

(b) 該糖鎖アスパラギン誘導体混合物または該糖鎖アスパラギン誘導体混合物に含まれる糖鎖アスパラギン誘導体を加水分解して得られる混合物をクロマトグラフィーに供して各糖鎖アスパラギン誘導体を分離する工程、を含む、糖鎖アスパラギン由来の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法、

(2) (b') 工程 (b) で分離された糖鎖アスパラギン誘導体を糖加水分解酵素を用いて加水分解する工程をさらに含む前記 (1) 記載の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法、

(3) 1種もしくは2種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物が、下記式 (A) の化合物および／または該化合物において1以上の糖残基が欠失した化合物を含むものである、前記 (1) または (2) 記載の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法、

(4) 脂溶性の保護基がフルオレニルメトキシカルボニル (Fmoc) 基である前記 (1) ~ (3) いずれか記載の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法、

(5) 工程 (a) が、非還元末端にシアル酸残基を有する1種もしくは2種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物に含まれる該糖鎖アスパラギンにFmoc基を導入し、かつシアル酸残基にベンジル基を導入して糖鎖アスパラギン誘導体混合物を得る工程である、前記 (1) ~ (3) いずれか記載の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法、

【0010】

(6) (a) 1種もしくは2種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物に含まれる該糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入して糖鎖アスパラギン誘導体混合物を得る工程、

(b) 該糖鎖アスパラギン誘導体混合物または該糖鎖アスパラギン誘導体混合物に含まれる糖鎖アスパラギン誘導体を加水分解して得られる混合物をクロマトグラフィーに供して各糖鎖アスパラギン誘導体を分離する工程、ならびに

(c) 工程 (b) で分離された糖鎖アスパラギン誘導体の保護基を除去して糖鎖アスパラギンを得る工程、

を含む、糖鎖アスパラギンの製造方法、

(7) (b') 工程 (b) で分離された糖鎖アスパラギン誘導体を糖加水分解酵素を用いて加水分解する工程、および/または

(c') 工程 (c) で得られた糖鎖アスパラギンを糖加水分解酵素を用いて加水分解する工程、

をさらに含む、前記 (6) 記載の糖鎖アスパラギンの製造方法、

(8) 1種もしくは2種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物が、下記式 (A) の化合物および/または該化合物において1以上の糖残基が欠失した化合物を含むものである、前記 (6) または (7) 記載の糖鎖アスパラギンの製造方法、

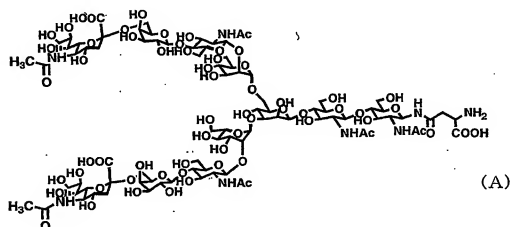
(9) 脂溶性の保護基がFmoc基である前記 (6) ~ (8) いずれか記載の糖鎖アスパラギンの製造方法、

(10) 工程 (a) が、非還元末端にシアル酸残基を有する1種もしくは2種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物に含まれる該糖鎖アスパラギンにFmoc

基を導入し、かつシアル酸残基にベンジル基を導入して糖鎖アスパラギン誘導体混合物を得る工程である、前記(6)～(8)いずれか記載の糖鎖アスパラギンの製造方法などである。

【0011】

【化1】



【0012】

これら糖鎖アスパラギン誘導体及び糖鎖アスパラギンの製造についての詳細は、上記先願に述べられているので、これを引用する。しかし若干先願の内容について述べると、先願の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法は、たとえば、天然の糖タンパク質に由来する糖鎖アスパラギン、好ましくはアスパラギン結合型糖鎖から得られる糖鎖アスパラギンの混合物に含まれる当該糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入(結合)して糖鎖アスパラギン誘導体の混合物を得た後に当該混合物を各糖鎖アスパラギン誘導体に分離することを1つの大きな特徴とする。なお、本明細書において、「糖鎖アスパラギン」とはアスパラギンが結合した状態の糖鎖をいう。また、「アスパラギン結合型糖鎖」とはタンパク質のポリペプチド中のアスパラギン(Asn)の酸アミノ基に、還元末端に存在するN-アセチルグルコサミンがN-グリコシド結合した糖鎖群であって、Man( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAcを母核とする糖鎖群をいう。「糖鎖アスパラギン誘導体」とはアスパラギン残基に脂溶性の保護基が結合した状態の糖鎖アスパラギンをいう。また、化合物の構造式中、「AcHN」はアセトアミド基を示す。



## 【0013】

前記するように、天然の糖タンパク質に由来する糖鎖は非還元末端の糖残基がランダムに欠失した糖鎖の混合物である。本発明者らは、意外にも天然の糖タンパク質に由来する糖鎖、具体的には糖鎖アスパラギンの混合物に含まれる当該糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入することで、当該保護基が導入された糖鎖アスパラギン誘導体の混合物を公知のクロマトグラフィーの手法を用いて容易に個々の糖鎖アスパラギン誘導体に分離することができることを見出した。それにより、種々の構造を有する糖鎖アスパラギン誘導体をそれぞれ大量に調製することが可能となった。たとえば、従来分離が困難であった類似構造の糖鎖アスパラギン誘導体同士の分離が可能となり、それらの化合物を各々、容易かつ大量に調製することができる。また、得られた糖鎖アスパラギン誘導体を元に、たとえば、糖加水分解酵素を順次作用させて糖残基を除去することにより、さらに様々な糖鎖アスパラギン誘導体を合成することもできる。

## 【0014】

このように、糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入して誘導体化することにより個々の糖鎖アスパラギン誘導体の分離が可能となったが、これは、脂溶性の保護基を導入したことにより糖鎖アスパラギン誘導体の全体の脂溶性が高まり、たとえば、好適に使用される逆相系カラムとの相互作用が格段に向上し、その結果、より鋭敏に糖鎖構造の差を反映して個々の糖鎖アスパラギン誘導体が分離されるようになったことによると考えられる。

さらに、先願によれば、得られた糖鎖アスパラギン誘導体の保護基を除去することにより種々の糖鎖アスパラギンを、人工的に容易かつ大量に得ることができる。

しかし、上記先願で得られる糖鎖アスパラギン誘導体、糖鎖アスパラギン及び糖鎖はいずれもフコースが結合していない糖鎖アスパラギン誘導体であった。

本発明では、上記先願に記載のないフコース結合体の糖鎖アスパラギン誘導体を得るものである。

## 【0015】

ここで、 $\alpha$  2, 3 結合体と  $\alpha$  2, 6 結合体の相異について以下に説明する。

$\alpha$  2, 3 結合体、 $\alpha$  2, 6 結合体とは、シアル酸とガラクトースとの結合様式を表わすものである。前者は、シアル酸の2位の炭素と、ガラクトースの3位の炭素が $\alpha$ 結合しているものをいい、後者は、シアル酸の2位の炭素と、ガラクトースの6位の炭素が $\alpha$ 結合しているものをいう。これらは、ガラクトースとの結合炭素の違いではある。

#### 【0016】

しかしながらこの違いは、例えば、インフルエンザウイルスは、シアル酸を末端に持つ糖鎖をレセプターとして認識している。しかし、ヒトとトリのインフルエンザウイルスではレセプター特異性が異なっている。前者は、シアル酸がガラクトースに $\alpha$  2, 6 結合した糖鎖を、後者はシアル酸がガラクトースに $\alpha$  2, 3 結合した糖鎖を特異的に認識する。シアル酸-ガラクトース間の結合様式の違い、さらにはシアル酸の相違が、インフルエンザウイルスの宿主域の制限に大きな役割を果たしていることが知られている。

#### 【0017】

##### 【発明の実施の形態】

本発明の方法においては先ず、出発化合物である脂溶性の保護基で保護されたジシアロ糖鎖アスパラギン ( $\alpha$  2, 6-11 糖-A s n-F m o c) を用いる。あるいは、脂溶性の保護基で保護されたアシアロ糖鎖アスパラギン (9 糖-A s n-F m o c) にシアル酸転移酵素を用いてシアル酸を転移させ、得られた脂溶性の保護基で保護された糖鎖アスパラギンをクロマトグラフィーに供することにより分離し、脂溶性の保護基で保護されたジシアロ糖鎖アスパラギン誘導体 ( $\alpha$  2, 3-11 糖-A s n-F m o c) および2種のモノシアロ糖鎖アスパラギン誘導体 ( $\alpha$  2, 3-10 糖-A s n-F m o c) を用いる。

#### 【0018】

当該保護基としては特に限定されるものではなく、例えば、F m o c 基や  $t$ -ブチルオキシカルボニル (B o c) 基、ベンジル基、アリル基、アリルオキシカルボニル基、アセチル基等の、カーボネート系またはアミド系の保護基等を使用することができる。得られた糖鎖アスパラギン誘導体を直ちに所望の糖ペプチドの合成に使用できるという観点から、当該保護基としては、F m o c 基またはB

o c基などが好ましく、Fm o c基がより好ましい。Fm o c基はシアル酸等比較的酸性条件に不安定な糖が糖鎖に存在する場合に特に有効である。また、保護基の導入は公知の方法（たとえば、Protecting groups in Organic chemistry, John Wiley & Sons INC., New York 1991, ISBN 0-471-62301-6を参照）に従って行えばよい。

#### 【0019】

たとえば、Fm o c基を用いる場合、糖鎖アスパラギンに対しアセトンを適量加えた後、さらに9-フルオレニルメチル-N-スクシニミジルカーボネートと炭酸水素ナトリウムを加えて溶解し、25℃にてアスパラギン残基へのFm o c基の結合反応を行うことにより、当該糖鎖アスパラギンのアスパラギン残基にFm o c基を導入することができる。

以上の操作により、脂溶性の保護基が導入された糖鎖アスパラギン誘導体が得られる。

シアル酸としては、一般に市販されているシアル酸あるいは化学合成したものをを用いることができる。

#### 【0020】

シアル酸転移酵素としては、一般に市販されているシアル酸転移酵素を用いることができ、転移させるシアル酸あるいはシアル酸の誘導体の種類により適宜選択することができる。具体的には、 $\alpha$ 2,3転移酵素であるRat Recombinant由来のもの、 $\alpha$ 2,6転移酵素であるRat Liver由来のものを挙げることができる。また、シアリターゼを用いてpH調整等により平衡をずらすことにより、シアル酸あるいはシアル酸の誘導体を転移させてもよい。

上記糖鎖アスパラギン誘導体のクロマトグラフィーによる分離は、適宜、公知のクロマトグラフィーを単独または複数組み合わせることで用いることにより行うことができる。

#### 【0021】

たとえば、得られた糖鎖アスパラギン誘導体混合物をゲル濾過カラムクロマトグラフィーで精製後、HPLCを用いて精製する。HPLCにおいて用い得るカラムとしては逆相系のカラムが好適であり、たとえば、ODS、Phenyl系

、ニトリル系や、陰イオン交換系のカラム、具体的には、たとえば、ファルマシア社製モノQカラム、イヤترون社製イアトロビーズカラムなどが利用可能である。分離条件等は適宜、公知の条件を参照して調整すればよい。以上の操作により、糖鎖アスパラギン誘導体混合物から所望の各糖鎖アスパラギン誘導体を得ることができる。

#### 【0022】

次に、上記で分離された糖鎖アスパラギン誘導体を加水分解することにより、所望の糖鎖構造を有する糖鎖アスパラギン誘導体を効率的に得ることができる。たとえば、糖鎖アスパラギン誘導体を分離する段階においては混合物に含まれる糖鎖アスパラギン誘導体の種類を制限して糖鎖アスパラギン誘導体を大まかに分離し、次いで加水分解、たとえば、糖加水分解酵素を用いて加水分解することにより所望の糖鎖構造を有する糖鎖アスパラギン誘導体を効率的に得ることができる。なお、加水分解は前記と同様に行うことができる。特に、所望の糖鎖構造を有する糖鎖アスパラギン誘導体をより効率的に得る観点から、糖残基の切断様式が明確な糖加水分解酵素を用いて加水分解するのが好ましい。

#### 【0023】

たとえば、ガラクトース残基の除去は、加水分解される化合物を緩衝液（たとえば、リン酸緩衝溶液、酢酸緩衝溶液、グッド緩衝溶液など）に溶かし、公知の条件に従ってガラクトース加水分解酵素を用いてガラクトース残基の切断反応を行うことにより成し得る。なお、加水分解される化合物は各々単離されたものであっても混合物であってもよい。この反応で用いるガラクトース加水分解酵素は市販されている公知のエキシ型の酵素を利用するのが好ましい。また、同様の活性を有するものであれば、新たに単離された酵素、遺伝子工学的に創製された酵素であってもよい。次いで、前記と同様にして、反応後に得られる反応液（糖残基が切断された糖鎖アスパラギン誘導体の混合物）をクロマトグラフィーに供し、各糖鎖アスパラギン誘導体を得ればよい。たとえば、分離はHPLC（ODSカラム、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル＝82：18）で行うのが好ましい。

#### 【0024】

N-アセチルグルコサミン残基の除去は、加水分解される化合物を緩衝液（たとえば、リン酸緩衝溶液、酢酸緩衝溶液、グッド緩衝溶液など）に溶かし、公知の条件に従ってN-アセチルグルコサミン加水分解酵素を用いてN-アセチルグルコサミン残基の切断反応を行うことにより成し得る。また、N-アセチルヘキシサミニダーゼ加水分解酵素を用いてもよい。なお、加水分解される化合物は各々単離されたものであっても混合物であってもよい。この反応で用いる各酵素は市販されているエキソ型の酵素を利用するのが好ましい。また、同様の活性を有するものであれば、新たに単離された酵素、遺伝子工学的に創製された酵素であってもよい。次いで、前記と同様にして、反応後に得られる反応液（糖残基が切断された糖鎖アスパラギン誘導体の混合物）をクロマトグラフィーに供し、各糖鎖アスパラギン誘導体を得ればよい。たとえば、分離はHPLC（ODSカラム、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液：メタノール＝65：35または50mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル＝82：18）で行うのが好ましい。

#### 【0025】

マンノース残基の除去は、加水分解される化合物を緩衝液（たとえば、リン酸緩衝溶液、酢酸緩衝溶液、グッド緩衝溶液など）に溶かし、公知の条件に従ってマンノース加水分解酵素を用いてマンノース残基の切断反応を行うことにより成し得る。なお、加水分解される化合物は各々単離されたものであっても混合物であってもよい。この反応で用いるマンノース加水分解酵素は市販されているエキソ型の酵素を利用するのが好ましい。また、同様の活性を有するものであれば、新たに単離された酵素、遺伝子工学的に創製された酵素であってもよい。次いで、前記と同様にして、反応後に得られる反応液（糖残基が切断された糖鎖アスパラギン誘導体の混合物）をクロマトグラフィーに供し、各糖鎖アスパラギン誘導体を得ればよい。たとえば、分離はHPLC（ODSカラム、展開溶媒は、10～200mM程度の酢酸アンモニウムなどの緩衝溶液とアセトニトリル、あるいはエタノール、あるいはメタノール、あるいはブタノール、あるいはプロパノールなどの脂溶性のある水溶性有機溶剤を適宜混ぜて用いることができる。ここに例示する場合、展開溶媒としては50mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニ

リル=82:18が好適である)で行うのが好ましい。

#### 【0026】

このようにして得られた各糖鎖アスパラギン誘導体を得た後、フコースを転移させることにより本発明の脂溶性の保護基でアスパラギンのアミノ基窒素が保護された糖鎖アスパラギンの非還元末端側のN-アセチルグルコサミンに少なくとも1個以上のフコースを含む新規な糖鎖アスパラギン誘導体を製造することができる。

フコースとしては、一般に市販されているフコースあるいは化学合成したものをを用いることができる。

#### 【0027】

フコース転移酵素としては、一般に市販されているフコース転移酵素を用いることができ、転移させるフコースの種類により適宜選択することができる。具体的には、糖鎖アスパラギンの非還元末端側のN-アセチルグルコサミンにフコースを転移させる酵素であるFucosyltransferase V (Human, Recombinant) を挙げることができる。また、フコース加水分解酵素をもちいてpH調整等により平衡をずらすことにより、フコースを転移させてもよい。

上記糖鎖アスパラギン誘導体のクロマトグラフィーによる分離は、適宜、公知のクロマトグラフィーを単独でまたは複数組み合わせるにより行うことができる。

#### 【0028】

たとえば、得られた糖鎖アスパラギン誘導体混合物をゲル濾過カラムクロマトグラフィーで精製後、HPLCを用いて精製する。HPLCにおいて用い得るカラムとしては逆相系のカラムが好適であり、たとえば、ODS、Phenyl系、ニトリル系や、陰イオン交換系のカラム、具体的には、たとえば、ファルマシア社製モノQカラム、イヤトロン社製イアトロビーズカラムなどが利用可能である。分離条件等は適宜、公知の条件を参照して調整すればよい。以上の操作により、糖鎖アスパラギン誘導体混合物から所望の各糖鎖アスパラギン誘導体を得ることができる。

#### 【0029】

このように、各糖鎖アスパラギン誘導体を得た後、さらに各種糖加水分解酵素等を用いて当該誘導体を加水分解し、糖鎖の非還元末端の糖残基を除去することにより、たとえば、糖鎖の末端の分岐構造が不均一な様々な糖鎖アスパラギン誘導体をそれぞれ単一化合物として得ることができる。また、種々の糖加水分解酵素を用い、加水分解する順番やその種類を変えることで、より多くの種類の糖鎖アスパラギン誘導体を製造することができる。

### 【0030】

従来の方法によれば、極限られた糖鎖構造を有する糖鎖アスパラギン誘導体を分析スケールで得るのにさえ膨大な時間とコストが必要であったが、本発明によれば、特別の装置や試薬を必要とすることなく、慣用のゲルろ過カラム、HPLCカラムや、少なくとも3種類の糖加水分解酵素（たとえば、ガラクトース加水分解酵素、マンノース加水分解酵素、N-アセチルグルコサミン加水分解酵素）等を使って、2週間程度で所望の糖鎖構造を有する糖鎖アスパラギン誘導体を1グラム程度調製することが可能である。

### 【0031】

また本発明は、種々の単離された糖鎖アスパラギンを大量に得ることができる糖鎖アスパラギンの製造方法を提供する。当該方法は、前記糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法に従う糖鎖アスパラギン誘導体の製造工程に続き、さらに、得られた糖鎖アスパラギン誘導体から保護基を除去する工程を含むものである。

### 【0032】

糖鎖アスパラギン誘導体からの保護基の除去は、公知の方法に従って行うことができる（たとえば、Protecting groups in Organic chemistry, John Wiley & Sons INC., New York 1991, ISBN 0-471-62301-6を参照）。たとえば、保護基がFmoc基である場合、N,N-ジメチルホルムアミド（DMF）中、糖鎖アスパラギン誘導体にモルホリンを加えて反応を行うことによりFmoc基を除去することができる。また、Boc基は弱酸を反応させることで除去することができる。保護基除去後、所望により適宜、公知の方法、たとえば、ゲル濾過カラム、イオン交換カラムなどを使用する各種クロマトグラフィーや、HPLCによる分離という方法によって精製することにより、糖鎖アスパラギンを得てもよい。

## 【0033】

さらに本発明は、種々の単離された糖鎖を大量に得ることができる糖鎖の製造方法を提供する。当該方法は、前記糖鎖アスパラギンの製造方法に従う糖鎖アスパラギンの製造工程に続き、さらに、得られた糖鎖アスパラギンからアスパラギン残基を除去する工程を含むものである。

糖鎖アスパラギンからのアスパラギン残基の除去は、公知の方法に従って行うことができる。たとえば、糖鎖アスパラギンを無水ヒドラジンと反応させた後、アセチル化することによりアスパラギン残基を除去して糖鎖を得ることができる。また、糖鎖アスパラギンを塩基性水溶液で加熱還流後、アセチル化することによってもアスパラギン残基を除去して糖鎖を得ることができる。アスパラギン残基除去後、所望により適宜、公知の方法、たとえば、ゲル濾過カラム、イオン交換カラムなどを使用する各種クロマトグラフィーや、HPLCによる分離という方法によって精製してもよい。

## 【0034】

このように、本発明によれば、所望の糖鎖構造を有する糖鎖アスパラギン誘導体を安価かつ効率的に大量に製造することができる。

かかる糖鎖類は医薬品開発等の分野において非常に有用である。たとえば、医薬品開発における応用例としては、ガンのワクチン合成があげられる。細胞がガン化すると体内にはなかった糖鎖が発現することが知られている。また、当該糖鎖を化学的に合成し、ワクチンとして個体に投与すると、ガンの増殖が抑制されることも知られている。そこで、本発明により所望の糖鎖類を製造することができれば、ガンの治療に有効なワクチンの合成を行うことが可能である。また、本発明により得られる糖鎖類を、さらに化学的な反応および糖転移酵素による反応などを組み合わせて新たな糖残基を結合させて誘導体化し、新規なワクチンの合成を行うことも可能である。

## 【0035】

## 【実施例】

以下に参考例、実施例を挙げて説明するが、本発明は何らこれら実施例に限定されるものではない。



## 【0036】

参考例1  $\alpha$  2,6-ジシアロ糖鎖アスパラギンの合成

卵由来粗精製SGP (シアリルグリコペプチド) 2.6 gをトリス-塩酸・塩化カルシウム緩衝溶液 (TRIZMA BASE 0.05 mol/l、塩化カルシウム 0.01 mol/l、pH 7.5) 100 mlに溶解させた。これにアジ化ナトリウム 58 mg (772  $\mu$ mol) とアクチナーゼ-E (科研製薬社製) 526 mgを加え、37℃で静置した。65時間後、再びアクチナーゼ-Eを263 mg加え、更に37℃で24時間静置した。この溶液を凍結乾燥した後、残留物をゲル濾過カラムクロマトグラフィー (Sephadex G-25, 2.5  $\phi$  × 1m、展開溶媒は水、流速は1.0 ml/min) で2回精製し、 $\alpha$  2,6-ジシアロ糖鎖アスパラギンを1.3 g (555  $\mu$ mol) 得た。

## 【0037】

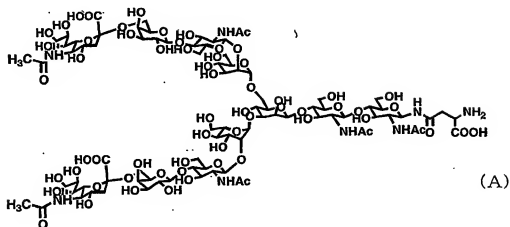
得られたジシアロ糖鎖アスパラギンの物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 30℃)

5.15 (1H, s, Man4-H1), 5.06 (1H, d, GlcNAc1-H1), 4.95 (1H, s, Man4'-H1), 4.82 (1H, s, Man3-H1), 4.69 (1H, d, GlcNAc2-H1), 4.67 (2H, d, GlcNAc5,5'-H1), 4.53 (2H, d, Gal6,6'-H1), 4.34 (1H, d, Man3-H2), 4.27 (1H, d, Man4'-H2), 4.19 (1H, d, Man4-H2), 3.03 (1H, dd, AsN- $\beta$ CH), 3.00 (1H, dd, AsN- $\beta$ CH), 2.76 (2H, dd, NeuAc7,7'-H3eq), 2.15 (18H, s×6, -Ac), 1.79 (2H, dd, NeuAc7,7'-H3ax)

## 【0038】

## 【化2】



## 【0039】

参考例2 化合物1、2、3および4の合成

参考例1で得られた $\alpha$ 2,6-ジシアロ糖鎖アスパラギン(609mg, 26  $\mu$ mol)を水20.7mlに溶解させ、さらに0.1規定塩酸13.8mlを加えた。この溶液を70℃で35分間加熱した後速やかに氷冷し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えpH7とした。これを凍結乾燥した後、残留物をゲル濾過カラムクロマトグラフィー(Sephadex G-25、2.5 $\phi$ ×1m、展開溶媒は水、流速は1.0ml/min)で精製したところ、 $\alpha$ 2,6-ジシアロ糖鎖アスパラギン、2種の $\alpha$ 2,6-モノシアロ糖鎖アスパラギンおよびシアロ糖鎖アスパラギンの混合物534mgを得た。この4成分はそれぞれを単離することなく次の工程に進めた。

なお、得られた糖鎖混合物の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 30℃)

5.13 (s, Man4-H1), 5.12 (s, Man4-H1), 5.01 (d, GlcNAc1-H1), 4.94 (s, Man4'-H1), 4.93 (s, Man4'-H1), 4.82 (s, Man3-H1), 4.60 (d, GlcNAc2-H1), 4.58 (d, GlcNAc5,5'-H1), 4.47 (dd, Gal6, 6'-H1), 4.44 (d, Gal6, 6'-H1), 4.24 (d, Man3-H2), 4.19 (d, Man4'-H2), 4.11 (d, Man4-H2), 2.97 (bdd, AsN- $\beta$ CH), 2.72 (dd, Neu

Ac7-H3eq, NeuAc7-H3eq), 2.64 (bdd, AsN- $\beta$ CH), 2.15 (s $\times$ 5, -Ac), 1.79 (dd, NeuAc7-H3ax, NeuAc7'-H3ax)

#### 【0040】

得られた糖鎖の混合物 429mg をアセトン 16.3ml と水 11.2ml に溶解させた。ここに 9-フルオレニルメチル-N-スクシニミジルカーボネート (155.7mg, 461.7 $\mu$ mol) と炭酸水素ナトリウム (80.4mg, 957 $\mu$ mol) を加え、室温で 2 時間攪拌した。この溶液をエバポレーターに供してアセトンを除き、残りの溶液をゲル濾過カラムクロマトグラフィー (Sephadex G-25, 2.5 $\phi$  $\times$ 1m、展開溶媒は水、流速は 1.0ml/min) で精製したところ、化合物 1、化合物 2 および 3、化合物 4 の混合物 309mg が得られた。この混合物を HPLC (ODS カラム、展開溶媒は 50mM 酢酸アンモニウム水溶液:メタノール=65:35、2.0 $\phi$  $\times$ 25cm、流速 3ml/min) を用いて精製したところ、51 分後に化合物 1 が、67 分後に化合物 2 および 3 の混合物が、93 分後に化合物 4 が溶出した。それぞれを取り分け凍結乾燥を行った後、ゲル濾過カラムクロマトグラフィー (Sephadex G-25, 2.5 $\phi$  $\times$ 30cm、展開溶媒は水、流速は 1.0ml/min) で脱塩することで目的の化合物 2 および 3 の混合物 150mg を得た。

#### 【0041】

なお、得られた化合物 1 の物理的データは以下の通りである。

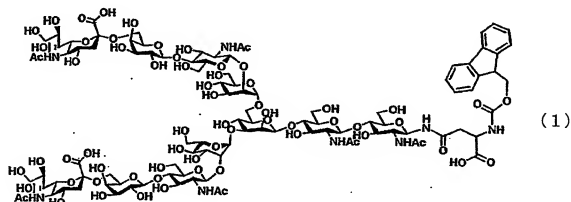
<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O, 30℃)

7.99 (2H, d, Fmoc), 7.79 (2H, d, Fmoc), 7.55 (4H, m, Fmoc), 5.15 (1H, s, Man4-H1), 5.06 (1H, d, GlcNAc1-H1), 4.95 (1H, s, Man4'-H1), 4.82 (1H, s, Man3-H1), 4.69 (1H, d, GlcNAc2-H1), 4.67 (2H, d, GlcNAc5,5'-H1), 4.53 (2H, d, Gal6,6'-H1), 4.34 (1H, d, Man3-H2), 4.27 (1H, d, Man4'-H2), 4.19 (1H, d, Man4-H2), 3.03 (1H, bdd, AsN- $\beta$ CH), 3.00 (1H, bdd, AsN- $\beta$ C

H), 2.76 (2H, dd, NeuAc 7, 7' -H3eq), 2.15 (18 H, s×6, -Ac), 1.79 (2H, dd, NeuAc 7, 7' -H3ax); HRMS Calcd for C<sub>103</sub>H<sub>154</sub>N<sub>8</sub>NaO<sub>66</sub> [M+N a+] 2581.8838, found, 2581.8821

【0042】

【化3】



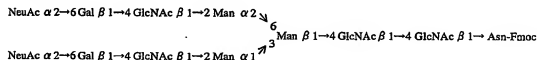
【0043】

上記の糖鎖の構造を記号化すると次のようになる。ここで

NeuAc:シアル酸 Gal:D-ガラクトース GlcNAc:N-アセチルグルコサミン Man:D-マンノース Asn:アスパラギンを示す。

【0044】

【化4】



(1-a)

【0045】

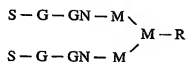
上記式(1-a)を更に簡略化すると次の(1-b)のように示すことができる。ここで

S:NeuAc G:Gal GN:GlcNAc M:Man R:  
 GlcNAc-GlcNAc-Asn-Fmoc

を示す。ただし化合物1～3でのS-GはNeuAc  $\alpha$ 2→6Galを示す。

【0046】

【化5】



(1-b)

【0047】

また、得られた化合物2および3の混合物の物理的データは以下の通りである。

。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $30^\circ\text{C}$ )

7.99 (d, Fmoc), 7.79 (d, Fmoc), 7.55 (m, Fmoc), 5.14 (s, Man4-H1), 5.12 (s, Man4-H), 5.00 (d, GlcNAc1-H1), 4.94 (s, Man4'-H1), 4.93 (s, Man4'-H1), 4.82 (s, Man3-H1), 4.60 (d, GlcNAc2-H1), 4.58 (d, GlcNAc5,5'-H1), 4.46 (dd, Gal6,6'-H1), 4.44 (d, Gal6,6'-H1), 4.24 (d, Man3-H2), 4.19 (d, Man4'-H2), 4.11 (d, Man4-H2), 2.97 (bdd, AsN- $\beta$ CH), 2.72 (dd, NeuAc7-H3eq, NeuAc7-H3eq), 2.64 (bdd, AsN- $\beta$ CH), 2.15 (s $\times$ 5, -Ac), 1.79 (dd, NeuAc7-H3ax, NeuAc7'-H3ax)

【0048】

また、得られた化合物4の物理的データは以下の通りである。

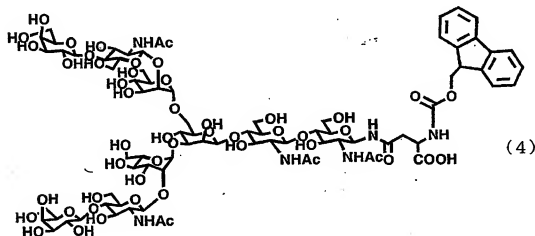
$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $30^\circ\text{C}$ )

7.99 (2H, d, Fmoc), 7.79 (2H, d, Fmoc), 7.55 (4H, m, Fmoc), 5.12 (1H, s, Man4-H1), 5.06 (1H, d, GlcNAc1-H1), 4.93 (1H, s, Man4'-H1), 4.82 (1H, s, Man3-H1), 4.69 (1H, d, GlcNAc2-H

1), 4.67 (2H, d, GlcNAc 5,5' -H1), 4.53 (2H, d, Gal 6,6' -H1), 4.34 (1H, d, Man3-H2), 4.27 (1H, d, Man4' -H2), 4.19 (1H, d, Man4-H2), 3.03 (1H, bdd, AsN- $\beta$ CH), 3.00 (1H, bdd, AsN- $\beta$ CH), 2.15 (12H, s $\times$ 4, -Ac); HRMS Calcd for  $C_{81}H_{120}N_6NaO_{50}$  [M+Na<sup>+</sup>] 1999.6930, found, 1999.6939

【0049】

【化6】



【0050】

上記の化合物4の構造の簡略化したものを表2に示す。

【0051】

参考例3 化合物2、3の合成および単離

参考例2で得られた化合物2、3の混合物(5.0mg, 2.2 $\mu$ mol)を220 $\mu$ Lの水に溶解させ、22mMの炭酸セシウム水溶液を100 $\mu$ L加え、pH7.0とした。この溶液を凍結乾燥した。乾燥後の固形物にN,N-ジメチルホルムアミドを430 $\mu$ L加え、更に6.6 $\mu$ molのベンジルプロマイド/N,N-ジメチルホルムアミド溶液を20 $\mu$ L加えた。この溶液をアルゴン雰囲気下で攪拌した。48時間後、TLC(展開溶媒は1M NH<sub>4</sub>OAc:イソプロパノール=2:1を用いた)にて原料の消失を確認した後、4.4mLのジエチルエ

ーテルを加えて化合物を沈殿させた。沈殿した糖鎖を濾過し、残った糖鎖を水に溶解させ凍結乾燥した。凍結乾燥後の残留物を分取HPLC (YMC Pack ed Column D-ODS-5 S-5 120A ODS No.20 20178、20×250mm、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル=78：22、流速4.0mL/min) で精製したところ、8分後に化合物3が、91分後に化合物2が溶出した。それぞれを取り分け、更にODSカラム (コスモシル75C18-OPN、15×100mm、最初にH<sub>2</sub>Oを50mL流し、次に25%アセトニトリルを流して溶出させた) で脱塩したところ、目的とする化合物2が1.6mg、化合物3が1.8mg得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

## 【0052】

化合物2の構造の簡略化したものを表1に示す。

<sup>1</sup>H-NMR (30℃)

δ 7.92 (d, 2H, J=7.5Hz, Fmoc), 7.71 (d, 2H, J=7.5Hz, Fmoc), 7.53-7.40 (m, 9H, Fmoc, -CH<sub>2</sub>-Ph), 5.38 (d, 1H, J=12.1Hz, -CH<sub>2</sub>-Ph), 5.31 (d, 1H, J=12.1Hz, -CH<sub>2</sub>-Ph), 5.12 (s, 1H, Man4-H-1), 4.99 (d, 1H, J=9.5Hz, GlcNAc1-H-1), 4.92 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.58 (m, 3H, GlcNAc2,5,5'-H-1), 4.47 (d, 1H, J=7.9Hz, Gal6'-H-1), 4.33 (d, 1H, J=7.9Hz, Gal6-H-1), 4.24 (bs, 1H, Man3-H-2), 4.19 (bs, 1H, Man4'-H-2), 4.11 (bs, 1H, Man4-H-2), 2.72 (bd, 1H, AsN-βCH), 2.68 (dd, 1H, J=4.6Hz, 12.7Hz, NeuAc7-H-3eq), 2.52 (dd, 1H, J=8.7Hz, 15.0Hz, AsN-βCH), 2.07, 2.04, 2.03, 2.02, 1.89 (each s, each 3H, Ac), 1.84 (dd, 1H, J=12.7Hz, 12.7Hz, NeuAc7-H3ax); MS (Fab) Calcd for C<sub>99</sub>H<sub>143</sub>N<sub>17</sub>NaO<sub>58</sub> [M+H+]

2380.8, found 2380.0

【0053】

化合物3の構造の簡略化したものを表1に示す。

<sup>1</sup>H-NMR (30℃)

δ 7.91 (d, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.71 (d, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.53-7.41 (m, 9H, Fmoc, -CH<sub>2</sub>-Ph), 5.37 (d, 1H, J=12.1 Hz, -CH<sub>2</sub>-Ph), 5.31 (d, 1H, J=12.1 Hz, -CH<sub>2</sub>-Ph), 5.12 (s, 1H, Man4-H-1), 4.99 (d, 1H, J=9.8 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.93 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.58 (m, 3H, GlcNAc2,5,5'-H-1), 4.46 (1H, d, J=7.8 Hz, Gal6-H-1), 4.33 (d, 1H, J=7.8 Hz, Gal6'-H-1), 4.24 (bs, 1H, Man3-H-2), 4.19 (bs, 1H, Man4'-H-2), 4.11 (bs, 1H, Man4-H-2), 2.72 (bd, 1H, AsN-βCH), 2.68 (dd, 1H, J=4.8 Hz, 13.0 Hz, NeuAc7-H-3eq), 2.52 (bdd, 1H, J=9.7 Hz, 14.1 Hz, AsN-βCH), 2.06, 2.05, 2.04, 2.02, 1.89 (each s, each 3H, Ac), 1.84 (dd, 1H, J=13.0 Hz, 13.0 Hz, NeuAc7-H-3ax); MS (Fab) Calcd for C<sub>99</sub>H<sub>143</sub>N<sub>7</sub>NaO<sub>58</sub> [M+H]<sup>+</sup> 2380.8, found 2380.5

【0054】

参考例4 化合物5および6の合成

参考例2で得られた化合物2および3の混合物 (224 mg, 97 μmol) とウシ血清アルブミン 24 mg を HEPES 緩衝溶液 (50 mM, pH 6.0) 22 ml に溶解させ、さらに *Diplococcus pneumoniae* 由来 β-ガラクトシダーゼ (1.35 U) を加えた。この溶液を 37℃ で 15 時間静置した後、凍結乾燥を行った。残留物を HPLC (ODS カラム、2.0 φ × 25 cm、展開溶媒は 50 mM 酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル = 85



: 15、流速3 ml/min) で精製したところ、129分後に化合物5が、134分後に化合物6が溶出した。それぞれを取り分け、凍結乾燥を行った。続いてHPLC [ODSカラム、2.0  $\phi$   $\times$  25 cm、展開溶媒は最初の15分間が水、16分後から30分後までは水: アセトニトリル (容量比) = 10: 0から85: 15、31分後から45分後までは水: アセトニトリル = 85: 15から80: 20になるようにグラジエントを掛けた。流速は3.0 ml/min) を用いて脱塩処理を行ったところ、目的とする化合物5が81 mg、化合物6が75 mg得られた。

#### 【0055】

なお、得られた化合物5の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 30 $^\circ\text{C}$ )

7.99 (2H, d, Fmoc), 7.79 (2H, d, Fmoc), 7.55 (4H, m, Fmoc), 5.15 (1H, s, Man4-H1), 5.06 (1H, d, GlcNAc1-H1), 4.95 (1H, s, Man4'-H1), 4.82 (1H, s, Man3-H1), 4.69 (1H, d, GlcNAc2-H1), 4.67 (2H, d, GlcNAc5,5'-H1), 4.53 (1H, d, Gal6'-H1), 4.34 (1H, d, Man3-H2), 4.27 (1H, d, Man4'-H2), 4.19 (1H, d, Man4-H2), 2.97 (1H, bdd, AsN- $\beta$ CH), 2.76 (1H, dd, NeuAc7'-H3eq), 2.61 (1H, bdd, AsN- $\beta$ CH), 2.15 (15H, s  $\times$  5, -Ac), 1.79 (1H, dd, NeuAc7'-H3ax); HRMS  
Calcd for  $\text{C}_{86}\text{H}_{127}\text{N}_7\text{NaO}_{53}$  [M+Na+] 2128.7356, found, 2128.7363

#### 【0056】

また、得られた化合物6の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 30 $^\circ\text{C}$ )

7.99 (2H, d, Fmoc), 7.79 (2H, d, Fmoc), 7.55 (4H, m, Fmoc), 5.15 (1H, s, Man4-H1), 5.06 (1H, d, GlcNAc1-H1), 4.95 (1H, s, Man4'-H1), 4.

8.2 (1H, s, Man3-H1), 4.69 (1H, d, GlcNAc2-H1), 4.67 (2H, d, GlcNAc5,5'-H1), 4.53 (1H, d, Gal6-H1), 4.34 (1H, d, Man3-H2), 4.27 (1H, d, Man4'-H2), 4.19 (1H, d, Man4-H2), 2.97 (1H, bdd, AsN- $\beta$ CH), 2.76 (1H, dd, NeuAc7-H3eq), 2.60 (1H, bdd, AsN- $\beta$ CH), 2.15 (15H, s $\times$ 5, -Ac), 1.79 (1H, dd, NeuAc7-H3ax); HRMS Calcd for  $C_{86}H_{125}N_7Na_3O_{53}$  [M+Na+] 2172.6995, found, 2172.7084

#### 【0057】

##### 参考例5 化合物7および8の合成

参考例4で得られた化合物5および6の混合物 (90mg, 47.3 $\mu$ mol) をそれぞれ分離することなく、ウシ血清アルブミン8mgと共にHEPES緩衝溶液 (50mM, pH6.0) 8.1mlに溶解させ、さらにBovine kidney由来 $\beta$ -グルコサミニダーゼ (シグマアルドリッチ社製、from Bovine kidney) を2.88U加えた。この溶液を37℃で18時間静置した後凍結乾燥し、残留物をHPLC (ODSカラム、2.0 $\phi$  $\times$ 25cm、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液: メタノール=65:35、流速3ml/min) で精製したところ、117分後に化合物7が、127分後に化合物8が溶出した。それぞれを取り分け、凍結乾燥を行った。続いてHPLC (ODSカラム、2.0 $\phi$  $\times$ 25cm、展開溶媒は最初の15分間が水、16分後から30分後までは水: アセトニトリル=10:0から85:15、31分後から45分後までは水: アセトニトリル=85:15から80:20になるようにグラジエントを掛けた。流速は3.0ml/min) を用いて脱塩処理を行ったところ、目的とする化合物7が40mg、化合物8が37mg得られた。

#### 【0058】

なお、得られた化合物7の物理的データは以下の通りである。

$^1$ H-NMR ( $D_2O$ , 30℃)

8.01 (2H, d, Fmoc), 7.80 (2H, d, Fmoc), 7.56 (

4H, m, Fmoc), 5.22 (1H, s, Man4-H1), 5.08 (1H, d, GlcNAc1-H1), 4.94 (1H, s, Man4'-H1), 4.84 (1H, s, Man3-H1), 4.69 (1H, d, GlcNAc2-H1), 4.67 (1H, d, GlcNAc5-H1), 4.55 (1H, d, Gal6-H1), 4.33 (1H, dd, Man3-H2), 4.20 (1H, dd, Man4-H2), 4.15 (1H, dd, Man4'-H2), 2.97 (1H, bdd, AsN- $\beta$ CH), 2.76 (2H, dd, NeuAc7, 7'-H3eq), 2.62 (1H, bdd, AsN- $\beta$ CH), 2.15 (12H, s $\times$ 4, -Ac), 1.79 (2H, dd, NeuAc7, 7'-H3ax); HRMS Calcd for C<sub>78</sub>H<sub>114</sub>N<sub>6</sub>NaO<sub>48</sub> [M+Na+] 1925.6562, found, 1925.6539

【0059】

また、得られた化合物8の物理的データは以下の通りである。

<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O, 30℃)

7.99 (2H, d, Fmoc), 7.79 (2H, d, Fmoc), 7.55 (4H, m, Fmoc), 5.15 (1H, s, Man4-H1), 5.06 (1H, d, GlcNAc1-H1), 4.95 (1H, s, Man4'-H1), 4.82 (1H, s, Man3-H1), 4.69 (1H, d, GlcNAc2-H1), 4.67 (2H, d, GlcNAc5, 5'-H1), 4.53 (2H, d, Gal6, 6'-H1), 4.34 (1H, d, Man3-H2), 4.27 (1H, d, Man4'-H2), 2.97 (1H, bdd, AsN- $\beta$ CH2), 2.76 (1H, dd, NeuAc7'-H3eq), 2.61 (1H, bdd, AsN- $\beta$ CH2), 2.15 (12H, s $\times$ 4, -Ac), 1.79 (1H, dd, NeuAc7'-H3ax); HRMS Calcd for C<sub>78</sub>H<sub>114</sub>N<sub>6</sub>NaO<sub>48</sub> [M+Na+] 1925.6562, found, 1925.6533

【0060】

参考例6 化合物9の合成

参考例5で得られた化合物7 (30mg, 473 $\mu$ mol) とウシ血清アルブ

ミン3mgをHEPES緩衝溶液(50mM, pH6.0)6mlに溶解させ、さらにJack Beans由来 $\alpha$ -マンノシダーゼを10U加えた。この溶液を37℃で21時間静置した後凍結乾燥し、続いてHPLC(ODSカラム、2.0 $\phi$ ×25cm、展開溶媒は最初の15分間が水、16分後から30分後までは水:アセトニトリル=10:0から85:15、31分後から45分後までは水:アセトニトリル=85:15から80:20になるようにグラジエントを掛けた。流速は3.0ml/min)を用いて精製したところ、目的とする化合物9が20mg得られた。

#### 【0061】

なお、得られた化合物9の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 30℃)

8.01 (2H, d, Fmoc), 7.80 (2H, d, Fmoc), 7.56 (4H, m, Fmoc), 5.00 (1H, d, GlcNAc1-H1), 4.95 (1H, s, Man4'-H1), 4.84 (1H, s, Man3-H1), 4.67 (1H, d, GlcNAc2-H1), 4.56 (1H, d, GlcNAc5-H1), 4.44 (1H, d, Gal6-H1), 4.11 (1H, dd, Man4'-H2), 4.07 (1H, dd, Man3-H2), 2.97 (1H, bdd, AsN- $\beta$ CH), 2.76 (1H, dd, NeuAc7'-H3eq), 2.62 (1H, bdd, AsN- $\beta$ CH), 2.15 (12H, s×4, -Ac), 1.79 (2H, dd, NeuAc7'-H3ax); HRMS Calcd for  $\text{C}_{72}\text{H}_{104}\text{N}_6\text{NaO}_{43}$  [M+Na+] 1763.6034, found, 1763.6074

#### 【0062】

参考例7 化合物10の合成

参考例5で得られた化合物8(40mg, 630 $\mu\text{mol}$ )とウシ血清アルブミン5gをHEPES緩衝溶液(50mM, pH6.0)7.8mlに溶解させ、Jack Beans由来 $\alpha$ -マンノシダーゼを38U加えた。この溶液を37℃で63時間静置した後凍結乾燥し、続いてHPLC(ODSカラム、2.0 $\phi$ ×25cm、展開溶媒は最初の15分間が水、16分後から30分後までは水

:アセトニトリル=10:0から85:15、31分後から45分後までは85:15から80:20になるようにグラジエントを掛けた。流速は3.0ml/min)を用いて精製したところ、目的とする化合物10が30mg得られた。

#### 【0063】

なお、得られた化合物10の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $30^\circ\text{C}$ )

8.01 (2H, d, Fmoc), 7.80 (2H, d, Fmoc), 7.56 (4H, m, Fmoc), 5.23 (1H, s, Man4-H1), 5.08 (1H, d, GlcNAc1-H1), 4.53 (1H, d, Gal6-H1), 4.32 (1H, dd, Man3-H2), 4.28 (1H, dd, Man4-H2), 2.81 (1H, bdd, AsN- $\beta$ CH), 2.76 (1H, dd, NeuAc7-H3eq), 2.59 (1H, bdd, AsN- $\beta$ CH), 2.13 (12H, s $\times$ 4, -Ac), 1.80 (1H, dd, NeuAc7H3ax); HR MS Calcd for  $\text{C}_{72}\text{H}_{104}\text{N}_6\text{NaO}_{43}$  [M+Na+] 1763.6034, found, 1763.6041

#### 【0064】

##### 参考例8 化合物11の合成

化合物5 (28mg,  $21.3\mu\text{mol}$ ) とウシ血清アルブミン1.0mgをHEPES緩衝溶液 (50mM, pH5.0,  $454\mu\text{L}$ ) に溶解させ、ノイラミニダーゼ (シグマアルドリッチ社製、from Vibrio Cholerae, 198mU) を加えた。この溶液を $37^\circ\text{C}$ で20時間静置した後、HPLC分析により反応終了を確認した。反応溶液をHPLC (YMC Packed Column D-ODS-5S-5 120A ODS No.2020178、 $20\times 250\text{mm}$ 、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液:アセトニトリル=80:20、流速 $4\text{mL/min}$ ) で精製した。更にODSカラム (コスモシル75C18-OPN、 $15\times 100\text{mm}$ 、最初に $\text{H}_2\text{O}$ を50mL流し、次に25%アセトニトリルを流して溶出させた) で脱塩したところ、目的とする化合物11 (17mg, 収率70%) が得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

## 【0065】

化合物11の構造の簡略化したものを表2に示す。

 $^1\text{H-NMR}$  (30℃)

$\delta$  7.91 (d, 2H,  $J=7.5\text{ Hz}$ , Fmoc), 7.71 (d, 2H,  $J=7.5\text{ Hz}$ , Fmoc), 7.51 (dd, 2H,  $J=7.5\text{ Hz}$ , Fmoc), 7.43 (dd, 2H,  $J=7.5\text{ Hz}$ , Fmoc), 5.12 (s, 1H, Man4-H-1), 4.99 (d, 1H,  $J=9.5\text{ Hz}$ , GlcNAc1-H-1), 4.92 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.58 (d, 1H,  $J=8.0\text{ Hz}$ , GlcNAc2-H-1), 4.55 (d, 1H,  $J=8.4\text{ Hz}$ , GlcNAc5'-H-1), 4.47 (d, 1H,  $J=7.8\text{ Hz}$ , Gal6'-H-1), 4.34 (t, 1H, Fmoc), 4.24 (bd, 1H,  $J=1.9\text{ Hz}$ , Man3-H-2), 4.18 (bdd, 1H,  $J=1.4\text{ Hz}$ , 3.3 Hz, Man4-H-2), 4.11 (bdd, 1H,  $J=1.4\text{ Hz}$ , 3.5 Hz, Man4'-H-2), 2.72 (bdd, 1H,  $J=3.0\text{ Hz}$ , 15.7 Hz, AsN- $\beta$ CH), 2.52 (bdd, 1H,  $J=8.7\text{ Hz}$ , 15.7 Hz, AsN- $\beta$ CH), 2.06, 2.05, 2.04, 1.89 (each s, each 3H, Ac); HRMS Calcd for  $\text{C}_{75}\text{H}_{110}\text{N}_6\text{NaO}_{45}$  [ $\text{M}+\text{Na}^+$ ] 1837.6402, found 1837.6471

## 【0066】

## 参考例9 化合物12の合成

化合物6 (20mg,  $9.4\text{ }\mu\text{mol}$ ) とウシ血清アルブミン1.6mgをHEPES緩衝溶液 (50mM, pH5.0,  $323\text{ }\mu\text{L}$ ) に溶解させ、ノイラミダーゼ (シグマアルドリッチ社製、from *Vibrio Cholerae*, 141mU) を加えた。この溶液を37℃で18時間静置した後、HPLC分析により反応終了を確認した。続いてHPLC (YMC Packed Column D-ODS-5 S-5 120A ODS No.2020178、 $20\times 250\text{ mm}$ 、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル=80:20、流速4mL/min) で精製した。更にODSカラム (コスモ

シール75C18-OPN、15×100mm、最初にH<sub>2</sub>Oを50mL流し、次に25%アセトニトリルを流して溶出させた)で脱塩したところ、目的とする化合物12(13mg, 収率76%)を得た。得られた化合物の構造は<sup>1</sup>H-NMRが標品と一致したことから確認した。

化合物12の構造の簡略化したものを表2に示す。

#### 【0067】

##### 参考例10 化合物13の合成

化合物7(45mg, 24μmol)とウシ血清アルブミン1.7mgをHEPES緩衝溶液(50mM, pH5.0, 820μL)に溶解させ、ノイラミニダーゼ(シグマアルドリッチ社製、from *Vibrio Cholerae*, 134mU)を加えた。この溶液を37℃で14時間静置した後、HPLC分析により反応終了を確認した。続いて、反応溶液をHPLC(YMC Packed Column D-ODS-5 S-5 120A ODS No.2 020178、20×250mm、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液:アセトニトリル=80:20、流速4mL/min)で精製した。更にODSカラム(コスモシール75C18-OPN、15×100mm、最初にH<sub>2</sub>Oを50mL流し、次に25%アセトニトリルを流して溶出させた)で脱塩したところ、目的とする化合物13(28mg, 収率74%)が得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

化合物13の構造の簡略化したものを表2に示す。

#### 【0068】

##### <sup>1</sup>H-NMR (30℃)

δ 7.92 (d, 2H, J=7.5Hz, Fmoc), 7.71 (d, 2H, J=7.5Hz, Fmoc), 7.51 (dd, 2H, J=7.5Hz, Fmoc), 7.44 (dd, 2H, J=7.5Hz, Fmoc), 5.10 (s, 1H, Man4-H-1), 4.99 (d, 1H, J=9.5Hz, GlcNAc1-H-1), 4.92 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.58 (d, 2H, GlcNAc2,5'-H-1), 4.47 (d, 1H, J=8.0Hz, Gal6'-H-1), 4.35 (t, 1H, Fmo

c), 4.24 (bd, 1H,  $J=1.9$  Hz, Man3-H-2), 4.11 (bs, 1H, Man4'-H-2), 4.07 (bs, 1H, Man4-H-2), 2.72 (bd, 1H,  $J=15.5$  Hz, AsN- $\beta$ CH), 2.52 (bdd, 1H,  $J=8.7$  Hz, 15.5 Hz, AsN- $\beta$ CH), 2.06, 2.04, 1.89 (each s, each 3H, Ac); HRMS Calcd for  $C_{67}H_{97}N_5NaO_{40}$  [ $M+Na+$  1634.5608, found, 1634.5564

## 【0069】

## 参考例11 化合物14の合成

化合物8 (47mg, 25  $\mu$ mol) とウシ血清アルブミン1.9mgをHEPES緩衝溶液 (50mM, pH5.0, 840  $\mu$ L) に溶解させ、ノイラミダーゼ (シグマアルドリッチ社製、from *Vibrio Cholerae*, 369mU) を加えた。この溶液を37℃で37時間静置した後、HPLC分析により反応終了を確認した。反応溶液を凍結乾燥し、続いてHPLC (YMC Packed Column D-ODS-5 S-5 120A ODS No.2020178、20 $\times$ 250mm、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液:アセトニトリル=80:20、流速4mL/min) で精製した。更にODSカラム (コスモシール75C18-OPN、15 $\times$ 100mm、最初にH<sub>2</sub>Oを50mL流し、次に25%アセトニトリルを流して溶出させた) で脱塩したところ、目的とする化合物14 (26mg, 収率65%) を得た。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

化合物14の構造の簡略化したものを表2に示す。

## 【0070】

<sup>1</sup>H-NMR (30℃)

$\delta$  7.92 (d, 2H,  $J=7.5$  Hz, Fmoc), 7.71 (d, 2H,  $J=7.5$  Hz, Fmoc), 7.51 (dd, 2H,  $J=7.5$  Hz, Fmoc), 7.43 (dd, 2H,  $J=7.5$  Hz, Fmoc), 5.12 (s, 1H, Man4-H-1), 4.99 (d, 1H,  $J=9.4$  Hz, GlcNAc1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.77 (s, 1H, Man3



-H-1), 4.57 (bd, 2H, GlcNAc 2,5'-H-1), 4.46 (d, 1H, J=7.5 Hz, Gal 6'-H-1), 4.34 (t, 3H, Fmoc), 4.24 (bs, 1H, Man 4'-H-2), 4.19 (bs, 1H, Man 4-H-2), 2.72 (bd, 1H, J=15.5 Hz, AsN-βCH), 2.52 (bdd, 1H, J=9.2 Hz, 15.5 Hz, AsN-βCH), 2.06, 2.05, 1.89 (each s, each 3H, Ac); HR MS Calcd for C<sub>67</sub>H<sub>97</sub>N<sub>5</sub>NaO<sub>40</sub> [M+Na<sup>+</sup>] 1634.5608, found, 1634.5644

## 【0071】

## 参考例12 化合物15の合成

化合物9 (32 mg, 18.4 μmol) とウシ血清アルブミン 2.5 mg を HEPES 緩衝溶液 (50 mM, pH 5.0, 713 μL) に溶解させ、ノイラミニダーゼ (シグマアルドリッチ社製、from *Vibrio Cholerae*, 134 mU) を加えた。この溶液を 37℃ で 17 時間静置した後、HPLC 分析により反応終了を確認した。続いて、反応溶液を HPLC (YMC Packed Column D-ODS-5 S-5 120A ODS No. 2 020178, 20×250 mm、展開溶媒は 50 mM 酢酸アンモニウム水溶液: アセトニトリル=80:20、流速 4 mL/min) で精製した。更に ODS カラム (コスモシル 75 C18-OPN, 15×100 mm、最初に H<sub>2</sub>O を 50 mL 流し、次に 25% アセトニトリルを流して溶出させた) で脱塩したところ、目的とする化合物 15 (13 mg, 収率 52%) が得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

化合物 15 の構造の簡略化したものを表 2 に示す。

## 【0072】

<sup>1</sup>H-NMR (30℃)

δ 7.92 (d, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.71 (d, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.51 (dd, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.44 (dd, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 5.00 (d, 1H, J=9.9 Hz, GlcNAc 1-H-1), 4.92 (s, 1H, Man 4'-H-

1), 4.75 (s, 1H, Man3-H-1), 4.58 (d, 2H, J=7.5 Hz, GlcNAc2,5'-H-1), 4.47 (d, 1H, J=7.8 Hz, Gal6'-H-1), 4.34 (t, 1H, Fmoc), 4.10 (bd, 1H, Man3-H-2), 4.07 (bs, 1H, Man4'-H-2), 2.72 (bdd, 1H, J=15.5 Hz, AsN- $\beta$ CH), 2.52 (bdd, 1H, J=9.2 Hz, 15.5 Hz, AsN- $\beta$ CH), 2.07, 2.05, 1.89 (each s, each 3H, Ac); MS (Fab), Calcd for  $C_{61}H_{88}N_5O_{35}$  [M+H]<sup>+</sup> 1450.5, found, 1450.3

## 【0073】

## 参考例13 化合物16の合成

化合物10 (28mg, 16  $\mu$ mol) とウシ血清アルブミン1.7mgをHEPES緩衝溶液 (50mM, pH5.0, 624  $\mu$ L) に溶解させ、ノイラミニダーゼ (シグマアルドリッチ社製、from Vibrio Cholerae, 117mU) を加えた。この溶液を37℃で17時間静置した後、HPLC分析により反応終了を確認した。続いて、反応溶液をHPLC (YMC Packed Column D-ODS-5 S-5 120A ODS No.2 020178、20×250mm、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液: アセトニトリル=80:20、流速4mL/min) で精製した。更にODSカラム (コスモシル75C18-OPN、15×100mm。最初にH<sub>2</sub>Oを50mL流し、次に25%アセトニトリルを流して溶出させた) で脱塩したところ、目的とする化合物16 (14.6mg, 収率68%) が得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

化合物16の構造の簡略化したものを表2に示す。

## 【0074】

<sup>1</sup>H-NMR (30℃)

$\delta$  7.92 (d, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.71 (d, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.50 (dd, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.43 (dd, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 5.12 (s, 1H, Ma

n4-H-1), 4.99 (d, 1H,  $J=9.5\text{ Hz}$ , GlcNAc1-H-1), 4.77 (s, 1H, Man3-H-1), 4.57 (d, 2H,  $J=7.2\text{ Hz}$ , GlcNAc2-H-1), 4.46 (d, 1H,  $J=7.8\text{ Hz}$ , Gal6-H-1), 4.34 (t, 1H, Fmoc), 4.22 (bd, 1H,  $J=2.7\text{ Hz}$ , Man3-H-2), 4.19 (b, 1H, Man4-H-2), 2.72 (bdd, 1H,  $J=15.5\text{ Hz}$ , AsN- $\beta$ CH), 2.52 (bdd, 1H,  $J=9.8\text{ Hz}$ ,  $15.5\text{ Hz}$ , AsN- $\beta$ CH), 2.05 (s, 6H, Ac $\times$ 2), 1.89 (s, 3H, Ac); MS (Fab), Calcd for  $\text{C}_{61}\text{H}_{88}\text{N}_5\text{O}_{35}$  [M+H $^{+}$ ] 1450.5, found, 1450.3

## 【0075】

参考例14 Fmoc基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護したジシアロ $\alpha$ 2, 3糖鎖アスパラギン (化合物17) およびFmoc基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護した2種のモノシアロ $\alpha$ 2, 3糖鎖アスパラギン (化合物18及び化合物19) の合成

参考例2で得られたFmoc基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護したアシアロ糖鎖アスパラギン (化合物4) にシアル酸転移酵素を用いてCMP-シアル酸を転移させた。

シアル酸転移酵素として $\alpha$ 2, 3転移酵素である市販のRat, Recombinant由来のものを用いた。

参考例2で得られた化合物4 (20mg,  $10.1\mu\text{mol}$ ) を50mMカコジル酸緩衝液 (pH=6.0, 5ml) に溶解させた後、牛血清アルブミン (BSA, 5mg) を加える。これに、CMP-シアル酸 (26mg,  $40.4\mu\text{mol}$ )、Alkaline phosphatase ( $5\mu\text{l}$ , 125unit) を加え均一化する。最後に、 $\alpha$ 2, 3-Sialyltransferase (CALBIOCHEM社製、 $100\mu\text{l}$ ) を加え37℃で48時間静置させる。HPLCで反応をモニターしながら原料が目的量まで減少した時点で反応を終了させ、反応液をメンブランフィルターにて濾過する。濾液を濃縮し液量を減じた後、HPLC分取カラムにて精製した (YMC-Pack R&D ODS,

D-ODS-5-A, 20×250mm, AN/25mM AcONH<sub>4</sub> buffer=18/82, 7.5ml/min., wave length; 274 nm) ところ、25分後に化合物17が、それぞれ30分後、34分後に化合物19及び化合物18が溶出してきた。それぞれを分取した後、脱塩処理、次いで凍結乾燥を行うと、各化合物17、18、19がそれぞれ0.7mg (2.7%)、3.5mg (15.3%)、1.9mg (8.3%) 得られた。各化合物のNMRデータは以下のとおりである。

【0076】

化合物17の構造の簡略化したものを表3に示す。ただし化合物17~25でのS-GはNeuAc $\alpha$ 2 $\rightarrow$ 3Galを示す。

<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O, 30℃, HOD=4.81)

$\delta$  7.90 (d, 2H, Fmoc), 7.69 (d, 2H, Fmoc), 7.49 (dd, 2H, Fmoc), 7.42 (dd, 2H, Fmoc), 5.10 (s, 1H, Man4-H1), 4.97 (d, 1H, GlcNAc1-H1), 4.91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.50-4.60 (m, 4H), 4.34 (1H, Fmoc), 4.24 (bs, 1H, Man3-H2), 4.18 (bs, 1H, Man4-H2), 4.10 (m, 2H), 2.74 (m, 3H, AsN- $\beta$ CH, NeuAc7,7'-H3eq), 2.40-2.60 (m, 1H, AsN- $\beta$ CH), 2.05, 2.03, 2.02 (each s, Ac), 1.77 (dd, 2H, NeuAc7, 7'-H3ax)。

【0077】

化合物18の構造の簡略化したものを表3に示す。

<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O, 30℃, HOD=4.81)

$\delta$  7.90 (d, 2H, Fmoc), 7.69 (d, 2H, Fmoc), 7.49 (dd, 2H, Fmoc), 7.42 (dd, 2H, Fmoc), 5.10 (s, 1H, Man4-H1), 4.97 (d, 1H, GlcNAc1-H1), 4.90 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.50-4.60 (m), 4.45 (d, 1H), 4.33 (1H, Fmoc), 4.22 (m, 2H), 4.17 (bs, 1H, Man4-H2), 4.09 (m, 2H), 2.74 (m, 2H, As

N- $\beta$ CH, NeuAc7-H3eq), 2.45-2.60 (m, 1H, AsN- $\beta$ CH), 2.05, 2.03, 2.02, 2.00 (each s, Ac), 1.77 (dd, 1H, NeuAc7-H3ax)

【0078】

化合物19の構造の簡略化したものを表4に示す。

$^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 30°C, HOD=4.81)  
 $\delta$  7.90 (d, 2H, Fmoc), 7.69 (d, 2H, Fmoc), 7.49 (dd, 2H, Fmoc), 7.42 (dd, 2H, Fmoc), 5.10 (s, 1H, Man4-H1), 4.97 (d, 1H, GlcNAc1-H1), 4.90 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.47-4.60 (m), 4.43 (d, 1H), 4.32 (1H, Fmoc), 4.22 (bs, 2H), 4.17 (bs, 1H, Man4-H2), 4.06-4.13 (m, 2H), 2.72 (m, 2H, AsN- $\beta$ CH, NeuAc7-H3eq), 2.50-2.60 (m, 1H, AsN- $\beta$ CH), 2.05, 2.03, 2.01 (each s, Ac), 1.77 (dd, 1H, NeuAc7-H3ax).

【0079】

参考例15

参考例14で得られた化合物19 (2mg, 0.88  $\mu\text{mol}$ ) とウシ血清アルブミン1mgをHEPES緩衝溶液 (50mM, pH5.0) 100  $\mu\text{l}$  に溶解させ、さらに $\beta$ -ガラクトシダーゼ (生化学工業社製、from Jack Beans, 5  $\mu\text{L}$ , 100mU) を加えた。この溶液を37°Cで15時間静置した後、メンブランフィルターでろ過を行った。ろ液をHPLC (ODSカラム、2.0  $\phi$   $\times$  25cm、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル=82:18、流速7.5ml/min) で精製した後、溶媒を濃縮、次いで凍結乾燥を行った。残留物を水200  $\mu\text{l}$  に溶解させODS-カラムクロマトグラフィー (コスモシール75C18-opn、最初に水で洗浄を行い、次いで25%アセトニトリル水溶液で溶出させる) を用いて脱塩処理を行ったところ、目的とする化合物20が0.5  $\mu\text{g}$  得られた。NMRデータは以下のとおりである。

化合物20の構造の簡略化したものを表4に示す。

【0080】

$^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 30℃,  $\text{HOD}=4.81$ )  
 $\delta$  7.90 (d, 2H, Fmoc), 7.69 (d, 2H, Fmoc), 7.49 (dd, 2H, Fmoc), 7.42 (dd, 2H, Fmoc), 5.10 (s, 1H, Man4-H1), 4.98 (d, 1H, GlcNAc1-H1), 4.90 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.50-4.60 (m), 4.33 (1H, Fmoc), 4.22 (m, 2H), 4.17 (bs, 1H, Man4-H2), 4.10 (m, 2H), 2.74 (m, 2H, AsN- $\beta$ CH, NeuAc7-H3eq), 2.45-2.60 (m, 1H, AsN- $\beta$ CH), 2.05, 2.03, 2.01 (each s, Ac), 1.78 (dd, 1H, NeuAc7-H3ax)

【0081】

参考例16

参考例15で得られた化合物20 (1.8mg, 0.86 $\mu\text{mol}$ ) を、ウシ血清アルブミン1mgと共にHEPES緩衝溶液 (50mM, pH5.0) 90 $\mu\text{l}$  に溶解させ、さらにN-アセチル- $\beta$ -グルコサミニダーゼ (シグマアルドリッチ社製、from Jack Beans) を4 $\mu\text{l}$  (250mU) 加えた。この溶液を37℃で24時間静置した後、メンブランフィルターでろ過を行った。ろ液をHPLC (ODSカラム、2.0 $\phi$ ×25cm、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル=82:18、流速7.5ml/min) で精製した後、溶媒を濃縮、次いで凍結乾燥を行った。残留物を水200 $\mu\text{l}$  に溶解させODS-カラムクロマトグラフィー (コスモシル75C18-open、最初に水で洗浄を行い、次いで25%アセトニトリル水溶液で溶出させる) を用いて脱塩処理を行ったところ、目的とする化合物21が0.9 $\mu\text{g}$ 得られた。

化合物21の構造の簡略化したものを表4に示す。

【0082】

参考例17

参考例16で得られた化合物21 (0.8 mg, 0.42  $\mu$ mol) とウシ血清アルブミン1 mgをHEPES緩衝溶液 (50 mM, pH 5.0) 50  $\mu$ lに溶解させ、 $\alpha$ -マンノシダーゼ (シグマアルドリッチ社製、from Jack Beans) 30  $\mu$ l (2.9 U) 加えた。この溶液を37℃で63時間静置した後、メンブランフィルターでろ過を行った。ろ液をHPLC (ODSカラム、2.0  $\phi$   $\times$  25 cm、展開溶媒は50 mM酢酸アンモニウム水溶液: アセトニトリル = 80:20、流速7.5 ml/min) で精製した後、溶媒を濃縮、次いで凍結乾燥を行った。残留物を水200  $\mu$ lに溶解させODS-カラムクロマトグラフィー (コスモシル75C18-opn、最初に水で洗浄を行い、次いで25%アセトニトリル水溶液で溶出させる) を用いて脱塩処理を行ったところ、目的とする化合物22が0.6  $\mu$ g得られた。

化合物22の構造の簡略化したものを表4に示す。

#### 【0083】

##### 参考例18

参考例14で得られた化合物18 (1 mg, 0.44  $\mu$ mol) とウシ血清アルブミン1 mgをHEPES緩衝溶液 (50 mM, pH 5.0) 50  $\mu$ lに溶解させ、さらに $\beta$ -ガラクトシダーゼ (生化学工業社製、from Jack Beans, 5  $\mu$ L, 100 mU) を加えた。この溶液を37℃で15時間静置した後、メンブランフィルターでろ過を行った。ろ液をHPLC (ODSカラム、2.0  $\phi$   $\times$  25 cm、展開溶媒は50 mM酢酸アンモニウム水溶液: アセトニトリル = 82:18、流速7.5 ml/min) で精製した後、溶媒を濃縮、次いで凍結乾燥を行った。残留物を水200  $\mu$ lに溶解させODS-カラムクロマトグラフィー (コスモシル75C18-opn、最初に水で洗浄を行い、次いで25%アセトニトリル水溶液で溶出させる) を用いて脱塩処理を行ったところ、目的とする化合物23が0.3  $\mu$ g得られた。

化合物23の構造の簡略化したものを表3に示す。

#### 【0084】

##### 参考例19

参考例18で得られた化合物23 (1.0 mg, 0.48  $\mu$ mol) を、ウシ血

清アルブミン1mgと共にHEPES緩衝溶液(50mM, pH5.0) 50 $\mu$ lに溶解させ、さらにN-アセチル- $\beta$ -グルコサミニダーゼ(シグマアルドリッチ社製、from Jack Beans)を4 $\mu$ l(250mU)加えた。この溶液を37℃で22時間静置した後、メンブランフィルターでろ過を行った。ろ液をHPLC(ODSカラム、2.0 $\phi$ ×25cm、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液:アセトニトリル=82:18、流速7.5ml/min)で精製した後、溶媒を濃縮、次いで凍結乾燥を行った。残留物を水200 $\mu$ lに溶解させODS-カラムクロマトグラフィー(コスモシル75C18-opn、最初に水で洗浄を行い、次いで25%アセトニトリル水溶液で溶出させる)を用いて脱塩処理を行ったところ、目的とする化合物24が0.6 $\mu$ g得られた。

化合物24の構造の簡略化したものを表4に示す。

#### 【0085】

##### 参考例20

参考例19で得られた化合物24(1.0mg, 0.53 $\mu$ mol)とウシ血清アルブミン1mgをHEPES緩衝溶液(50mM, pH5.0) 50 $\mu$ lに溶解させ、 $\alpha$ -マンノシダーゼ(シグマアルドリッチ社製、from Jack Beans) 10 $\mu$ l(0.9U)加えた。この溶液を37℃で20時間静置した後、メンブランフィルターでろ過を行った。ろ液をHPLC(ODSカラム、2.0 $\phi$ ×25cm、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液:アセトニトリル=80:20、流速7.5ml/min)で精製した後、溶媒を濃縮、次いで凍結乾燥を行った。残留物を水200 $\mu$ lに溶解させODS-カラムクロマトグラフィー(コスモシル75C18-opn、最初に水で洗浄を行い、次いで25%アセトニトリル水溶液で溶出させる)を用いて脱塩処理を行ったところ、目的とする化合物25が0.5 $\mu$ g得られた。

化合物25の構造の簡略化したものを表4に示す。

#### 【0086】

##### 実施例1~18

参考例2、3および8~20で製造した各Fmoc-糖鎖アスパラギン 2n



mol を、トリス塩酸緩衝液 約10ml に溶解させた。このものに、GDP-  
フコース 200nmol、Fucosyltransferase V (Human, Recombinant) 0.5  
mU を加え、37℃で約2時間静置、反応させた。反応液を超純水20ml で希  
釈したのち、キャピラリー電気泳動 (fused silica capillary, 50mm i.  
d., 60cm, buffer; 100mM Tris-borate, pH=8.3, 100mM  
Heptane sulfonate, 印加電圧27kV, 温度25℃, 214mm) で分離を行  
い各目的物を得た。

【0087】

各実施例における原料及び目的物を表1~4に示す。表において、  
FはFuc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3GlcNAcを示す。

【0088】

【表 1】

	原料	目的物
実施例 1	$\begin{array}{c} \text{S}-\text{G}-\text{GN}-\text{M} \\ \quad \quad \quad \diagdown \\ \quad \quad \quad \text{M}-\text{R} \\ \text{G}-\text{GN}-\text{M} \end{array}$ (化合物 2)	$\begin{array}{c} \text{F} \\   \\ \text{S}-\text{G}-\text{GN}-\text{M} \\ \quad \quad \quad \diagdown \\ \quad \quad \quad \text{M}-\text{R} \\ \text{G}-\text{GN}-\text{M} \\   \\ \text{F} \end{array}$ $\begin{array}{c} \text{F} \\   \\ \text{S}-\text{G}-\text{GN}-\text{M} \\ \quad \quad \quad \diagdown \\ \quad \quad \quad \text{M}-\text{R} \\ \text{G}-\text{GN}-\text{M} \\   \\ \text{S}-\text{G}-\text{GN}-\text{M} \\ \quad \quad \quad \diagdown \\ \quad \quad \quad \text{M}-\text{R} \\ \text{G}-\text{GN}-\text{M} \\   \\ \text{F} \end{array}$
実施例 2	$\begin{array}{c} \text{G}-\text{GN}-\text{M} \\ \quad \quad \quad \diagdown \\ \quad \quad \quad \text{M}-\text{R} \\ \text{S}-\text{G}-\text{GN}-\text{M} \end{array}$ (化合物 3)	$\begin{array}{c} \text{F} \\   \\ \text{G}-\text{GN}-\text{M} \\ \quad \quad \quad \diagdown \\ \quad \quad \quad \text{M}-\text{R} \\ \text{S}-\text{G}-\text{GN}-\text{M} \\   \\ \text{F} \end{array}$ $\begin{array}{c} \text{F} \\   \\ \text{G}-\text{GN}-\text{M} \\ \quad \quad \quad \diagdown \\ \quad \quad \quad \text{M}-\text{R} \\ \text{S}-\text{G}-\text{GN}-\text{M} \\   \\ \text{G}-\text{GN}-\text{M} \\ \quad \quad \quad \diagdown \\ \quad \quad \quad \text{M}-\text{R} \\ \text{S}-\text{G}-\text{GN}-\text{M} \\   \\ \text{F} \end{array}$

【0089】

【表 2】

	原料	目的物
実施例 3	$\begin{array}{c} \text{G}-\text{GN}-\text{M} \\ \quad \quad \quad \diagdown \\ \text{G}-\text{GN}-\text{M} \quad \text{M}-\text{R} \end{array}$ (化合物 4)	$\begin{array}{c} \text{F} \\   \\ \text{G}-\text{GN}-\text{M} \\ \quad \quad \quad \diagdown \\ \text{G}-\text{GN}-\text{M} \quad \text{M}-\text{R} \\   \\ \text{F} \end{array}$ $\begin{array}{c} \text{F} \\   \\ \text{G}-\text{GN}-\text{M} \\ \quad \quad \quad \diagdown \\ \text{G}-\text{GN}-\text{M} \quad \text{M}-\text{R} \\   \\ \text{F} \end{array}$ $\begin{array}{c} \text{F} \\   \\ \text{G}-\text{GN}-\text{M} \\ \quad \quad \quad \diagdown \\ \text{G}-\text{GN}-\text{M} \quad \text{M}-\text{R} \\   \\ \text{F} \end{array}$ $\begin{array}{c} \text{F} \\   \\ \text{G}-\text{GN}-\text{M} \\ \quad \quad \quad \diagdown \\ \text{G}-\text{GN}-\text{M} \quad \text{M}-\text{R} \\   \\ \text{F} \end{array}$
実施例 4	$\begin{array}{c} \text{G}-\text{GN}-\text{M} \\ \quad \quad \quad \diagdown \\ \text{GN}-\text{M} \quad \text{M}-\text{R} \end{array}$ (化合物 1 1)	$\begin{array}{c} \text{F} \\   \\ \text{G}-\text{GN}-\text{M} \\ \quad \quad \quad \diagdown \\ \text{GN}-\text{M} \quad \text{M}-\text{R} \end{array}$
実施例 5	$\begin{array}{c} \text{GN}-\text{M} \\ \quad \quad \quad \diagdown \\ \text{G}-\text{GN}-\text{M} \quad \text{M}-\text{R} \end{array}$ (化合物 1 2)	$\begin{array}{c} \text{GN}-\text{M} \\ \quad \quad \quad \diagdown \\ \text{G}-\text{GN}-\text{M} \quad \text{M}-\text{R} \\   \\ \text{F} \end{array}$
実施例 6	$\begin{array}{c} \text{G}-\text{GN}-\text{M} \\ \quad \quad \quad \diagdown \\ \text{M} \quad \text{M}-\text{R} \end{array}$ (化合物 1 3)	$\begin{array}{c} \text{F} \\   \\ \text{G}-\text{GN}-\text{M} \\ \quad \quad \quad \diagdown \\ \text{M} \quad \text{M}-\text{R} \end{array}$
実施例 7	$\begin{array}{c} \text{M} \\ \quad \quad \quad \diagdown \\ \text{G}-\text{GN}-\text{M} \quad \text{M}-\text{R} \end{array}$ (化合物 1 4)	$\begin{array}{c} \text{M} \\ \quad \quad \quad \diagdown \\ \text{G}-\text{GN}-\text{M} \quad \text{M}-\text{R} \\   \\ \text{F} \end{array}$
実施例 8	$\begin{array}{c} \text{G}-\text{GN}-\text{M} \\ \quad \quad \quad \diagdown \\ \text{M}-\text{R} \end{array}$ (化合物 1 5)	$\begin{array}{c} \text{F} \\   \\ \text{G}-\text{GN}-\text{M} \\ \quad \quad \quad \diagdown \\ \text{M}-\text{R} \end{array}$
実施例 9	$\begin{array}{c} \text{M}-\text{R} \\ \quad \quad \quad \diagdown \\ \text{G}-\text{GN}-\text{M} \end{array}$ (化合物 1 6)	$\begin{array}{c} \text{M}-\text{R} \\ \quad \quad \quad \diagdown \\ \text{G}-\text{GN}-\text{M} \\   \\ \text{F} \end{array}$

【0090】

【表 3】

	原料	目的物
実施例 10	$\begin{array}{c} \text{S}-\text{G}-\text{GN}-\text{M} \diagup \text{M}-\text{R} \\ \text{S}-\text{G}-\text{GN}-\text{M} \diagup \end{array}$ (化合物 17)	$\begin{array}{c} \text{F} \\   \\ \text{S}-\text{G}-\text{GN}-\text{M} \diagup \text{M}-\text{R} \\   \\ \text{S}-\text{G}-\text{GN}-\text{M} \diagup \text{M}-\text{R} \\   \\ \text{F} \\   \\ \text{S}-\text{G}-\text{GN}-\text{M} \diagup \text{M}-\text{R} \\   \\ \text{S}-\text{G}-\text{GN}-\text{M} \diagup \text{M}-\text{R} \\   \\ \text{S}-\text{G}-\text{GN}-\text{M} \diagup \text{M}-\text{R} \\   \\ \text{S}-\text{G}-\text{GN}-\text{M} \diagup \text{M}-\text{R} \\   \\ \text{F} \end{array}$
実施例 11	$\begin{array}{c} \text{S}-\text{G}-\text{GN}-\text{M} \diagup \text{M}-\text{R} \\ \text{G}-\text{GN}-\text{M} \diagup \end{array}$ (化合物 18)	$\begin{array}{c} \text{F} \\   \\ \text{S}-\text{G}-\text{GN}-\text{M} \diagup \text{M}-\text{R} \\   \\ \text{G}-\text{GN}-\text{M} \diagup \text{M}-\text{R} \\   \\ \text{F} \\   \\ \text{S}-\text{G}-\text{GN}-\text{M} \diagup \text{M}-\text{R} \\   \\ \text{G}-\text{GN}-\text{M} \diagup \text{M}-\text{R} \\   \\ \text{S}-\text{G}-\text{GN}-\text{M} \diagup \text{M}-\text{R} \\   \\ \text{G}-\text{GN}-\text{M} \diagup \text{M}-\text{R} \\   \\ \text{F} \end{array}$

【0091】

【表 4】

	原料	目的物
実施例 12	$\begin{array}{c} \text{G}-\text{GN}-\text{M} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{S}-\text{G}-\text{GN}-\text{M} \end{array} \text{M}-\text{R}$ (化合物 19)	$\begin{array}{c} \text{F} \\   \\ \text{G}-\text{GN}-\text{M} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{S}-\text{G}-\text{GN}-\text{M} \\   \\ \text{F} \end{array} \text{M}-\text{R}$ $\begin{array}{c} \text{F} \\   \\ \text{G}-\text{GN}-\text{M} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{S}-\text{G}-\text{GN}-\text{M} \\   \\ \text{F} \end{array} \text{M}-\text{R}$ $\begin{array}{c} \text{G}-\text{GN}-\text{M} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{S}-\text{G}-\text{GN}-\text{M} \end{array} \text{M}-\text{R}$
実施例 13	$\begin{array}{c} \text{GN}-\text{M} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{S}-\text{G}-\text{GN}-\text{M} \end{array} \text{M}-\text{R}$ (化合物 20)	$\begin{array}{c} \text{GN}-\text{M} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{S}-\text{G}-\text{GN}-\text{M} \\   \\ \text{F} \end{array} \text{M}-\text{R}$
実施例 14	$\begin{array}{c} \text{M} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{S}-\text{G}-\text{GN}-\text{M} \end{array} \text{M}-\text{R}$ (化合物 21)	$\begin{array}{c} \text{M} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{S}-\text{G}-\text{GN}-\text{M} \\   \\ \text{F} \end{array} \text{M}-\text{R}$
実施例 15	$\begin{array}{c} \text{M}-\text{R} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{S}-\text{G}-\text{GN}-\text{M} \end{array}$ (化合物 22)	$\begin{array}{c} \text{M}-\text{R} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{S}-\text{G}-\text{GN}-\text{M} \\   \\ \text{F} \end{array}$
実施例 16	$\begin{array}{c} \text{S}-\text{G}-\text{GN}-\text{M} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{GN}-\text{M} \end{array} \text{M}-\text{R}$ (化合物 23)	$\begin{array}{c} \text{F} \\   \\ \text{S}-\text{G}-\text{GN}-\text{M} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{GN}-\text{M} \end{array} \text{M}-\text{R}$
実施例 17	$\begin{array}{c} \text{S}-\text{G}-\text{GN}-\text{M} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{M} \end{array} \text{M}-\text{R}$ (化合物 24)	$\begin{array}{c} \text{F} \\   \\ \text{S}-\text{G}-\text{GN}-\text{M} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{M} \end{array} \text{M}-\text{R}$
実施例 18	$\begin{array}{c} \text{S}-\text{G}-\text{GN}-\text{M} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{M}-\text{R} \end{array}$ (化合物 25)	$\begin{array}{c} \text{F} \\   \\ \text{S}-\text{G}-\text{GN}-\text{M} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{M}-\text{R} \end{array}$

【0092】

【発明の効果】

本発明によれば、脂溶性の保護基でアスパラギンのアミノ基窒素が保護された糖鎖アスパラギンの非還元末端側のN-アセチルグルコサミンに少なくとも1個以上のフコースを含む新規な糖鎖アスパラギン誘導体とその製造方法を提供することができる。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 脂溶性の保護基でアスパラギンのアミノ基窒素が保護された糖鎖アスパラギンの非還元末端側のN-アセチルグルコサミンに少なくとも1個以上のフコースを含む新規な糖鎖アスパラギン誘導体とその製造方法を提供する。

【解決手段】 脂溶性の保護基でアスパラギンのアミノ基窒素が保護された糖鎖アスパラギンの非還元末端側のN-アセチルグルコサミンに少なくとも1個以上のフコースを含む糖鎖アスパラギン誘導体。

【選択図】 なし

## 認定・付加情報

特許出願の番号

特願 2003-202708

受付番号

50301248382

書類名

特許願

担当官

第五担当上席

0094

作成日

平成15年 7月29日

&lt;認定情報・付加情報&gt;

【提出日】

平成15年 7月28日



特願 2003-202708

出願人履歴情報

識別番号

[502244258]

1. 変更年月日

2002年 7月 5日

[変更理由]

新規登録

住 所

神奈川県横浜市都筑区牛久保東2-4-2-205

氏 名

梶原 康宏

出願人履歴情報

識別番号

[302060306]

1. 変更年月日

2002年10月15日

[変更理由]

新規登録

住所

大阪府大阪市中央区大手通3丁目2番27号

氏名

大塚化学株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image  
problems checked, please do not report these problems to  
the IFW Image Problem Mailbox.**